

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670375

研究課題名(和文) 高速分子動力学法によるHCV抗ウイルス薬耐性化予測仮想アッセイシステムの構築

研究課題名(英文) Establishment of virtual assay system by molecular dynamic simulation of HCV antiviral resistance

研究代表者

坂本 直哉 (Sakamoto, Naoya)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10334418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：・NS5A蛋白とNS5A阻害薬分子、小胞体核酸、DAA分子のモデリングと分子動力学シミュレーションを実施し、NS5Aが安定して小胞体膜上に局在する最適構造を確定した。  
・NS5A阻害薬とNS5A二量体の結合構造をシミュレーションし、薬剤耐性変異の近傍に安定結合することを確認した。  
・分子動力学シミュレーションで得られた仮説を検証するためにNS5A阻害薬に対する耐性変異を有するHCV replicon増殖能および薬剤感受性を検証した。

研究成果の概要(英文)：1. We conducted a molecular dynamic simulation of NS5A protein, its dimer and NS5A inhibitor (daclatasvir), and designated individual optimal 3D structures.  
2. We conducted a molecular dynamic simulations of NS5A dimer and daclatasvir on the ER membrane.  
3. We conducted an in-vitro assay by using HCV replicon system and confirmed expected effects of resistance-associated substitutions.

研究分野：内科学

キーワード：ウイルス学 肝炎ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

近年 C 型肝炎ウイルス感染に対し、ウイルス蛋白を直接標的とした DAA(Direct Acting Antivirals)が開発され、ウイルス駆除率は約 90%まで向上した。しかし薬剤耐性ウイルスの出現が新たな治療抵抗因子となり、個々の症例における DAA の効果、耐性ウイルス出現を精緻に予測することが至急の課題である。臨床試験中の NS5A 阻害薬 Daclatasvir とプロテアーゼ阻害薬 Asunaprevir の併用療法では、80-88%でウイルス駆除が得られる一方、両剤の耐性変異が 1 箇所でもあるとウイルス駆除率が 50%以下に低下する(Karino, J Hepatol 2013)。しかし NS5A 阻害薬と NS5A 分子との正確な結合構造および耐性変異の影響が十分に解析されていないことから、耐性出現を予測することはきわめて困難である。

近年スーパーコンピュータなど計算能の飛躍的な進歩に伴い、蛋白・核酸など高分子の挙動と小分子薬剤との結合動態を精緻に解析する分子動力学シミュレーションが可能となった。申請者らは同手法を用いて NS5A 蛋白、小胞体膜、Daclatasvir をモデル化したシミュレーションを施行し、NS5A が予測された立体構造を保ちつつ安定な二量体を形成し小胞体膜状に局在することを確認した。

### 2. 研究の目的

申請者らは本研究において、高速コンピュータを用いた分子動力学シミュレーションにより(1)NS5A 阻害薬、NS3 プロテアーゼ阻害薬とそれぞれの標的蛋白との高精度の動的結合モデルを構築し、(2)薬剤耐性変異が標的結合性、複合体安定性に与える影響を解析、さらに(3)得られた結果を、標的蛋白(NS3, NS5A)に変異を導入した HCV replicon 細胞を用いた増殖・薬剤耐性レベルの解析で確認する。以上の研究で得られた知見より、個々の DAA 治療症例における治療効果、耐性変異出現を精緻に予測できる仮想アッセイシステムを構築する。

### 3. 研究の方法

以下の手法で段階的に研究を遂行する。後述の研究協力者からも支援を受け、計画を逐次検討しつつ遂行する。(1) NS5A, NS3 蛋白、核酸、DAA 分子のモデリングと分子動力学シミュレーションにより、NS5A 蛋白二量体および NS5A 蛋白-NS5A 阻害薬複合体の分子間相互作用を予測し、変異導入により、タンパク-Daclatasvir の affinity 低下を確認する。(2) HCV replicon 細胞を用いた変異 NS5A, NS3 蛋白の増殖、抗ウイルス効果に与える影響を解析し、シミュレーションで得られた仮説(モデル)を検証する。平成 27 年度以降にはさらに候補化合物(3)分子動力学シミュレーションにより同定した耐性変異の in vivo での機能、薬剤感受性を検証するため、ヒト

肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスにウイルス血清を接種し、薬剤投与後経時的に血中 HCV-RNA 量を測定する。

### 4. 研究成果

(1) HCV-NS5A 蛋白は小胞体局在蛋白であり細胞内では二量体として存在する。NS5A 蛋白と NS5A 阻害薬分子、小胞体核酸、DAA 分子のモデリングと分子動力学シミュレーションを実施し、NS5A 量体が安定して小胞体膜上に局在するための最適構造を確定した。

(2) 未だ正確な結合構造があきらかにされていない NS5A 阻害薬 Daclatasvir と NS5A 量体の結合構造をシミュレーションしたところ、薬剤耐性変異 L31, Y93 アミノ酸残基の近傍に結合が安定化することを確認した。

(3) 分子動力学シミュレーションで得られた仮説(モデル)を検証するために NS5A 阻害薬に対する耐性変異を有する HCV replicon および HCV genotype 1b 培養系を構築し、増殖能および薬剤感受性を解析し、シミュレーションでの結合安定性と薬剤感受性が逆相関することが確認された。

本研究の成果により、今後数多く導入される DAA プロトコルの症例に応じた適切な選択と適用決定のためのエビデンスを構築できる。また、ウイルス標的蛋白の遺伝情報のみから、治療効果、薬剤感受性、さらに治療による薬剤耐性化を in-silico でウイルス培養を行うことなく解析、予測する仮想検査システムを構築することが可能となる。

今後は、(1)NS5A 蛋白二量体および NS5A 蛋白-NS5A 阻害薬複合体の細胞内における動態、相互の分子間相互作用、およびアミノ酸変異存在時の変化を予測するため、分子動力学シミュレーションを下記の手順で施行する。

変異導入により、タンパク-Daclatasvir の affinity 低下を確認する。

変異導入により、Daclatasvir が結合していたサイトを物理的に埋め、静電的にも結合に不利な状況になることを確認する。

シミュレーションと実験について:シミュレーションを行うにあたって必要なインプットに関する実験-soaking, もしくは共結晶の構造・NMR による、結合領域の特定などを予備的に施行する。さらに(2)分子動力学シミュレーションにより同定した耐性変異の in vivo での機能、薬剤感受性を検証するため、ヒト肝細胞移植 Alb-uPA/SCID マウスにウイルス血清を接種し、薬剤投与後経時的に血中 HCV-RNA 量および標的タンパクの変異出現を解析する。

得られた知見より個々の DAA 治療症例における治療効果、耐性変異出現を精緻に予測できる仮想アッセイシステムを構築する。本研究の成果により (1)今後複数登場する DAA 併用プロトコルの適切な選択のためのエビデ

ンス構築、(2)HCV 蛋白-薬物相互作用の仮想空間での詳細な解析による、ウイルス感染ライフサイクルに関連する新たな薬物標的の同定、(3)In-silico 仮想アッセイシステム技術の応用範囲の拡大など、多分野での新たな研究の創造が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

1. Suda G, Kudo M, Nagasaka A, Furuya K, Yamamoto Y, Kobayashi T, Shinada K, Tateyama M, Konno J, Tsukuda Y, Yamasaki K, Kimura M, Umemura M, Izumi T, Tsunematsu S, Sato F, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N. Efficacy and safety of daclatasvir and asunaprevir combination therapy in chronic hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2016; Epub ahead of print. (査読有) doi:10.1007/s00535-016-1162-8
2. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, et al. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep* 2016;6:24767. (査読有) doi: 10.1111/tan.12684
3. Ito J, Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kumagai K, Kikuchi H, Miyagishima T, Kobayashi T, Kimura M, Yamasaki K, Umemura M, Izumi T, Tsunematsu S, Sato F, Tsukuda Y, Terashita K, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N, Group NS. Prevalence and characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants in patients with hepatitis C virus genotype 1b infection. *Hepatol Res* 2016. Epub ahead of print (査読有) doi: 10.1111/hepr.12685
4. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuizaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging* 2015;40:1492-1499. (査読有) doi: 10.1007/s00261-015-0352-9
5. Terashita K, Chuma M, Hatanaka Y, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Yokoo H, Ohmura T, Ishizu H, Muraoka S, Nagasaka A, Tsuji T, Yamamoto Y, Kurauchi N, Shimoyama N, Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, Maeda A, Ogawa K, Natsuizaka M, Kamachi H, Kakisaka T, Kamiyama T, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. ZEB1 expression is associated with prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Clin Pathol* 2015; Epub ahead of print (査読有) . doi: 10.1136/jclinpath-2015-203115
6. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Masaki T, Murayama A, Yamada N, Sugiyama R, Tsukuda S, Watashi K, Asahina Y, Sakamoto N et al. Amino Acid Polymorphisms in Hepatitis C Virus Core Affect Infectious Virus Production and Major Histocompatibility Complex Class I Molecule Expression. *Sci Rep* 2015;5:13994. (査読有) doi: 10.1038/srep13994
7. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N, Group NS. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res* 2015;45:837-845. (査読有) doi: 10.1111/hepr.12421
8. Sato F, Kubota Y, Natsuizaka M, Maehara O, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Suda G, Ohnishi S, Shimizu Y, Komatsu Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Whelan KA, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 2015;16:933-940. (査読有) doi:10.1080/15384047.2015.1040959
9. Nishida N, Ohashi J, Sugiyama M, Tsuchiura T, Yamamoto K, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Koike K, Yokosuka O, Tanaka E, Taketomi A, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N et al. Effects of HLA-DPB1 genotypes on chronic hepatitis B infection in Japanese individuals. *Tissue Antigens*

- 2015;86:406-412. (査読有)  
doi: 10.1111/tan.12684
10. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kusano-Kitazume A, Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired induction of interleukin 28B and expression of interferon lambda 4 associated with nonresponse to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30: 1075-1084. (査読有)  
doi: 10.1111/jgh.12902
  11. Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, Sakamoto N, et al. Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naïve and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2015;15:645-653. (査読有)  
doi: 10.1016/S1473-3099(15)70099-X
  12. Kobayashi Y, Komatsu Y, Yuki S, Fukushima H, Sasaki T, Iwanaga I, Uebayashi M, Okuda H, Kusumi T, Miyagishima T, Sogabe S, Tateyama M, Hatanaka K, Tsuji Y, Nakamura M, Konno J, Yamamoto F, Onodera M, Iwai K, Sakata Y, Abe R, Oba K, Sakamoto N. Randomized controlled trial on the skin toxicity of panitumumab in Japanese patients with metastatic colorectal cancer: HGCSG1001 study; J-STEPP. *Future Oncol* 2015;11:617-627. (査読有)  
doi: 10.2217/fon.14.251
  13. Kasai H, Kawakami K, Yokoe H, Yoshimura K, Matsuda M, Yasumoto J, Maekawa S, Yamashita A, Tanaka T, Ikeda M, Kato N, Okamoto T, Matsuura Y, Sakamoto N, Enomoto N, Takeda S, Fujii H, Tsubuki M, Kusunoki M, Moriishi K. Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication. *Sci Rep* 2015;5:16699. (査読有)  
doi: 10.1038/srep16699
  14. Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Saito K, Nakamura M, Wu S, Haga Y, Sasaki R, Sakamoto N, Shirasawa H, Okamoto H, Yokosuka O. The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;458:908-912. (査読有)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.058
  15. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Tanaka Y et al. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet* 2015;134:279-289. (査読有)  
doi: 10.1007/s00439-014-1520-7
  16. Omata M, Nishiguchi S, Ueno Y, Mochizuki H, Izumi N, Ikeda F, Toyoda H, Yokosuka O, Nirei K, Genda T, Umemura T, Takehara T, Sakamoto N, Mizokami M et al. Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial. *J Viral Hepat* 2014;21:762-768. (査読有)  
doi: 10.1111/jvh.12312
  17. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol* 2014;27:285-294. (査読有)  
doi: 10.1089/vim.2013.0140
  18. Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsunami H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. *J Viral Hepat* 2014;21:466-474. (査読有)  
doi: 10.1111/jvh.12171
  19. Iwasaki J, Kondo T, Darmanin S, Ibata M, Onozawa M, Hashimoto D, Sakamoto N, Teshima T. FIP1L1 presence in FIP1L1-RARA or FIP1L1-PDGFRα differentially contributes to the pathogenesis of distinct types of leukemia. *Ann Hematol* 2014;93:1473-1481. (査読有)  
doi: 10.1007/s00277-014-2085-1
  20. Chuma M, Sakamoto N, et al. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor-kappaB/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis* 2014;35:272-281. (査読有)  
doi: 10.1093/carcin/bgt343
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
- 坂本 直哉 (SAKAMOTO NAOYA)  
北海道大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10334418
- (2)研究分担者
- 遠藤 俊徳 (ENDO TOSHINORI)  
北海道大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：00323692

須田 剛生 (SUDA GOKI)  
北海道大学・医学研究科・特任助教  
研究者番号：20447460